

⑫ 公表特許公報(A)

平3-502167

⑬ 公表 平成3年(1991)5月23日

⑭ Int. Cl.⁵
C 12 Q 1/68
1/00

識別記号

A
C

庁内整理番号

6807-4B
6807-4B

審査請求 有

予備審査請求 未請求

部門(区分) 1(1)

(全 13 頁)

⑭ 発明の名称 核酸試験片及び所定の核酸を検出するためのその使用

⑮ 特 願 平2-503705

⑯ 出 願 平2(1990)1月26日

⑰ 翻訳文提出日 平2(1990)10月2日

⑱ 国際出願 PCT/US90/00452

⑲ 国際公開番号 WO90/08840

⑳ 国際公開日 平2(1990)8月9日

優先権主張 ㉑ 1989年2月3日 ㉒ 米国(US) ㉓ 306,954

㉔ 発 明 者 ファインドレイ, ジョン ブルー アメリカ合衆国, ニューヨーク 14612, ロチエスター, クロスローズ レーン 148

㉕ 出 願 人 イーストマン コダック カン アメリカ合衆国, ニューヨーク 14650, ロチエスター, ステイトパニー ストリート 343

㉖ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外3名

㉗ 指 定 国 A T(広域特許), B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特許), F I, F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, K R, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許), S U, U S

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. 少なくとも第1対向面及び第2対向面を有し、かつ前記対向面のうち少なくとも1つの対向面の少なくとも1つの個別ゾーン中に水不溶性核酸プローブを付着せしめている支持体を含んでなる核酸試験片であって、

前記プローブは、所定の核酸に対して相補的なオリゴヌクレオチドを含んでなり、このオリゴヌクレオチドは水不溶性粒子に共有結合しており、かつ実質的にいずれの前記プローブも前記対向面内に埋め込まれていない、核酸試験片。

2. 前記支持体が、実質的にすべての前記プローブがその表面上に残留するような平均孔寸法を有する多孔質膜である請求項1記載の試験片。

3. 前記支持体が、実質的に非多孔質の、非被覆紙である請求項1記載の試験片。

4. 前記基板がポリマーフィルムである請求項1記載の試験片。

5. 複数の水不溶性プローブを有し、各プローブが前記対向面上の区隔ゾーンに付着されており、かつ各プローブが別の所定の核酸に対して相補的なオリゴヌクレオチドを含んでなる請求項1記載の試験片。

6. 自蔵式試験具中に配備された請求項1記載の試験片。

7. 前記水不溶性粒子が、約0.1〜約10 μ mの直径を有するポリマー粒子である請求項1記載の試験片。

8. 前記固定化プローブが、HIV-I DNA に対して相補的な

オリゴヌクレオチドを含んでなる請求項1記載の試験片。

9. 前記の区隔ゾーンの各々が約1〜約30 μ m²の面積を占める請求項1記載の試験片。

10. 膜の一方の面の少なくとも1つの区隔ゾーン中に水不溶性核酸プローブを付着せしめている多孔質膜を含んでなる試験片であって、

前記プローブが、HIV-I DNA に対して相補的なオリゴヌクレオチドを含んでなり、このオリゴヌクレオチドは約0.1〜約10 μ mの平均直径を有するポリマー粒子に共有結合しており、実質的にいずれの前記プローブも前記膜表面内に埋め込まれていない試験片。

11. 前記プローブが、前記膜表面に、膜表面の1つ以上の区隔ゾーンにおいて付着されている請求項10記載の試験片。

12. 前記膜がコハク酸エステル化カゼインで予め被覆されている請求項10記載の試験片。

13. 前記プローブのオリゴヌクレオチドが、HIV-I ゲノムの gag 領域のヌクレオチド・セグメントに対して相補的な請求項10記載の試験片。

14. 所定核酸の検出方法であって、前記方法が、

A. 所定の核酸を含有すると推定される被検体を、少なくとも第1対向面及び第2対向面を有し、かつ前記対向面のうち少なくとも1つの対向面の少なくとも1つの区隔ゾーン中に水不溶性核酸プローブを付着せしめている支持体を含んでなる核酸試験片であって、

前記プローブは、前記の所定の核酸の第1の核酸配列に対

して相補的なオリゴヌクレオチドを含んでなり、このオリゴヌクレオチドは水不溶性粒子に共有結合しており、かつ実質的にいずれの前記プローブも前記対向面に埋め込まれていない、核酸試験片と接触させて、

所定の核酸及び前記水不溶性プローブのハイブリッド形成化産物を形成し、

B. 工程Aに先立って、と同時に又はに続いて、前記被検体を、前記所定の核酸に対して相補的な、検出可能に標識化されたプローブと接触させて、前記水不溶性プローブ及び前記標識化プローブの両者とハイブリッド形成した前記所定の核酸の固定化サンドウィッチ産物を形成し、

C. 前記固定化サンドウィッチ産物を非固定化物質から分離し、そして

D. 前記固定化サンドウィッチ産物を、前記被検体中の所定の核酸の量の指標として検出することを含んでなる検出方法。

15. 複数個の所定の核酸の検出方法であって、前記試験片が、複数個の水不溶性プローブを含んでなり、各プローブが前記対向面上の区隔ゾーン中に付着されており、かつ各プローブが別個の所定の核酸に対して相補的なオリゴヌクレオチドを含んでなる請求項14記載の方法。

16. 前記水不溶性プローブが、HIV-I DNA に対して相補的なオリゴヌクレオチドを含んでなるものである請求項14記載の方法。

17. 前記試験片上の前記区隔ゾーンの各々が約1〜約30mm²

21. 自蔵式試験具によって行われる請求項18記載の方法。

22. 前記支持体が微孔質濾過膜である請求項18記載の方法。

23. 前記支持体が実質的に非多孔質の、非被覆紙である請求項18記載の方法。

24. 前記水不溶性粒子が、約5μ未満の直径を有するポリマー粒子である請求項18記載の方法。

25. HIV-I DNA の検出方法であって、前記方法が、

A. 生物学的被検体に見出されるHIV-I DNA を、相補的なプライマー、デオキシリボヌクレオチド三リン酸及びサーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) から誘導されたポリメラーゼの存在下で増幅させ、

B. 前記の増幅HIV-I DNA を、膜の一方の面の少なくとも1つの区隔ゾーンに水不溶性核酸プローブを付着せしめた微孔質膜を含んでなり、

前記プローブがHIV-I DNA に対して相補的なオリゴヌクレオチドであり、このオリゴヌクレオチドは約0.1〜約5μの平均直径を有するポリマー粒子に共有結合しており、実質的にいずれの前記プローブも前記膜表面内に埋め込まれていない、核酸試験片と接触させて、

HIV-I DNA 及び前記水不溶性プローブの固定化されたハイブリッド形成化産物を形成し、

C. 前記固定化産物を非固定化物質から分離し、そして

D. 前記固定化産物を、前記被検体中のHIV-I DNA の量の指標として検出することを含んでなる方法。

の面積を有する請求項14記載の方法。

18. 所定の核酸の検出方法であって、前記方法が、

A. 被検体に見出される所定核酸を、相補的なプライマー、デオキシリボヌクレオチド三リン酸及び重合剤の存在下で増幅させ、

B. 前記の増幅した所定の核酸を、少なくとも第1対向面及び第2対向面を有し、かつ前記対向面のうち少なくとも1つの対向面の少なくとも1つの区隔ゾーン中に水不溶性核酸プローブを付着せしめている支持体を含んでなる核酸試験片であって、

前記プローブは、前記の所定の核酸に対して相補的なオリゴヌクレオチドを含んでなり、このオリゴヌクレオチドは水不溶性粒子に共有結合しており、かつ実質的にいずれの前記プローブも前記対向面に埋め込まれていない、試験片と接触させて、

所定核酸及び前記水不溶性プローブの固定化されたハイブリッド形成化産物を形成し、

C. 前記固定化産物を非固定化物質から分離し、そして

D. 前記固定化産物を、前記被検体中の所定の核酸の量の指標として検出することを含んでなる方法。

19. 工程Aにおいて使用した前記プライマーの少なくとも1つが検出可能に標識化されている請求項18記載の方法。

20. 前記固定化産物が、検出可能に標識化されている第2プローブを用いて検出される請求項18記載の方法。

26. 少なくとも1つのプライマーがビオチン化され、かつ前記固定化産物の検出が、それを、アビジン及び酵素の複合体と接触させることにより遂行される請求項25記載の方法。

27. 前記複合体がペルオキシダーゼを含んでなり、かつ前記複合体及び前記産物の接触に続いて、前記産物を過酸化水素及びペルオキシダーゼの存在下で色素を生じるロイコ染料組成物と接触させる請求項26記載の方法。

核酸試験片及び所定の核酸
を検出するためのその使用

関連出願についての言及

本願は、John B. Pindlay 等による、1989年2月3日出願の米国特許出願第 306,954号の一部継続出願である。

発明の分野

本発明は診断操作、詳細には、核酸の検出のための診断操作に関する。本発明はまたそのような操作に有用な試験片に関する。

発明の背景

核酸のハイブリッド形成は、核酸の同定を研究するための周知操作である。ハイブリッド形成は相補的塩基の対合に基づいている。1本鎖核酸を溶液中でインキュベートすると相補的塩基配列が対合して2本鎖ハイブリッド分子を形成する。これらの分子は所望の場合には変性により分離することができる。

疾病の診断、遺伝的欠陥、遺伝子工学もしくは遺伝子の特性決定のために、所定の（ターゲットとしてもまた知られている）核酸の存在についての被検体のアッセイに使用することができるか、または汚染物又は他の医学上もしくは研究上

0235726号（1987年9月9日公告）及び米国特許第4,673,657号（Christianに対して1987年6月16日発行）がある。

当該技術分野における有意な進展は、米国特許第4,683,195号（Mullis 等に対して1987年7月28日発行）及び米国特許第4,683,202号（Mullis に対して1987年7月28日発行）明細書に記載されている。広範囲にわたり詳細に論ずることなく、これらの特許は、プライマーが重合剤（例えば、ポリメラーゼ）と4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下で核酸の鋳型にハイブリッド形成し、次いでこれらのプライマー類からエクステンション産物が生成される増幅方法を記載している。これらの産物は変性され、次いでそれらのその後の検出を容易にするための、所定の核酸の数および量を増幅する周期的な反応の鋳型として使用される。この増幅方法は、少量の所定の核酸から大量の検出可能な物質を生成するために、望ましいだけ多数回、周期的に実施することができる。

標的配列が検出可能量まで十分に増幅されさえすれば、検出方法は限定的ではない。放射性、同位体、ビオチンもしくは酵素（ビオチン-アビジン結合を介してプローブに結合された）で標識化したプローブ又はゲル電気泳動の使用を含む、多くの検出技法が当該技術分野において記載されている。他のプローブは支持体上に増幅された産物を捕捉するのに使用される。

米国特許第 4,727,019号（Valkirs等に対して1988年2月23日の）は、直接、多孔質基板（例えば、膜）に局所領域中に固定化されたプローブを使用して核酸を検出すること

の目的のために、血液、食品又は他の物質を試験するための核酸プローブアッセイもまた知られている〔例えば、米国特許第 4,358,535号（Falkow 等に対して1982年11月9日発行）、国際公開第88/01302号（1988年2月25日公告）及びその中に述べられている引例を参照されたい。〕

核酸プローブアッセイの中には、2個のプローブを使用し、3部分ハイブリッド化生成物の状態で2個のプローブの間に問題の核酸を挟みこむ、当該技術分野において“サンドウィッチ・アッセイ”として知られているものがある。一般に、一方のプローブは“捕捉(capture)”プローブであり、これは固体表面上に、固定化されているか又はそのようになることができるものであり、他方のプローブは検出可能に標識化されるか又はそのようになることができるものである。サンドウィッチ・アッセイは、所定の核酸を固体状支持体上に直接固定化する必要がなく、かつ1つではなく2つのハイブリッド形成反応が検出のために必要なのでより高い特異性の可能性を提供するという利点を有する。

プローブ・アッセイに用いられる、ほとんどの“捕捉”プローブは、一般に、検出される所定の核酸の少なくとも1つの核酸配列と相補的であるオリゴヌクレオチドを形成するヌクレオチド配列から構成される。核酸のアフィニティ・クロマトグラフィ分離用及びプローブ・アッセイ用に、オリゴヌクレオチドを固体状支持体へ結合させるための様々な方法が知られている。かかる方法を述べているかなりの数の文献の中には、国際公開第88/01302号（上述）、ヨーロッパ特許第

ができる分析方法及び分析装置について記載している。あるいは、プローブを多孔質マトリックス内に埋め込むこともできる。プローブをかかえる支持体に直接結合すること又はそれらをその中に埋め込むことは、所定の核酸が被検体中に一般に高濃度存在する場合には精確なしかも高感度のアッセイを提供するであろうが、その濃度が非常に低い場合には限度がある。この技術分野においては研究が進行しているので、より少量（単一分子であったとしても）を検出する必要性は極めて重要である。従って、多くの従来の、核酸試験方法及び装置は不十分である。

同様に、多孔質のマトリックス内に埋め込まれたポリマー粒子に結合した核酸を利用する分析方法がヨーロッパ特許第 0200381号（1986年11月5日に公告）に記載されている。更に、複数個の核酸が同時に検出できるようにいくつかのプローブをマトリックスの区隔域に埋め込むこともできる。

1種又はそれ以上の核酸を同時に検出するという欲求が当該技術分野においては残っている。しかしながら、上述したように、ますます低濃度のこれらの核酸を検出する必要性もまたある。このことはプローブ及び分析操作に関して高感度を必要とするものである。

発明の要約

上記課題は、少なくとも第1対向面及び第2対向面を有し、かつ前記対向面のうち少なくとも1つの対向面の少なくとも1つの区隔ゾーン中に水不溶性核酸プローブを付着せしめている

支持体を含んでなる核酸試験片であって、

前記プローブは、所定の核酸に対して相補的なオリゴヌクレオチドを含んでなり、このオリゴヌクレオチドは水不溶性粒子に共有結合で結合しており、かつ実質的にいずれの前記プローブも前記対向面内に埋め込まれていない、核酸試験片により克服される。

更に、所定の核酸の検出方法は、

A. 所定の核酸を含有すると推定される被検体を、上記核酸試験片と接触させて、

所定の核酸及び前記水不溶性プローブのハイブリッド形成化産物を形成し、

B. 工程Aに先立って、と同時に又は後に続いて、前記被検体を、前記所定の核酸に対して相補的な、検出可能に標識化されたプローブと接触させて、前記水不溶性プローブ及び前記標識化プローブの両者とハイブリッド形成した前記所定の核酸の固定化サンドウィッチ産物を形成し、

C. 前記固定化サンドウィッチ産物を非固定化物質から分離し、そして

D. 前記固定化サンドウィッチ産物を、被検体中の所定の核酸の量の指標として検出する、

ことを含んでなる。

更に詳細には、所定の核酸の検出方法は、

A. 被検体に見出される所定の核酸を、相補的プライマー、デオキシリボヌクレオチド三リン酸及び重合剤の存在下で増幅させ、

数個の所定の核酸を同時に検出できることである。好ましい実施態様においては、本発明の試験片は、アッセイ用のすべての試薬を含んでもよい、自蔵式試験具内に組み入れられる。いくつかの試薬が予め組み入れられていない場合は、この試験具は試薬添加後のアッセイ用の容器になりうる。

図面の簡単な説明

第1図は、支持体の局所区域に水不溶性プローブを固定化せしめた、本発明の試験片の平面図である。

第2図は、第1図の線II-IIに沿った断面図である。

第3図は、支持体に局所的に配置されたプローブを複数個有する、本発明の別の試験片についての第2図と同様の断面図である。

第4図は、試験ウェルの底部に位置した膜上に、水不溶性プローブを局所的に配置した、本発明の更に別の実施態様の断面図である。

発明の詳細な記載

核酸の検出において検出されもしくは使用されるプライマー、プローブ又はオリゴマーフラグメントに言及する際、本明細書において使用されるものとして、用語“オリゴヌクレオチド”は2個もしくはそれ以上の好ましくは3個より多いデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドからなる分子を指す。その正確な大きさは限定的ではないが、しかしオリゴヌクレオチドの最終的な用途又は機能を含む多くの要因

B. 前記増幅された所定の核酸を、上記核酸試験片と接触させて、

所定の核酸及び前記水不溶性プローブの固定化されたハイブリッド形成化産物を形成し、

C. 前記固定化産物を非固定化物質から分離し、そして

D. 前記固定化産物を、被検体中の所定の核酸の量の指標として検出する、

ことを含んでなる。

本発明は、被検体、例えば生物学的被検体中の1種又はそれ以上の核酸の迅速かつ精確な検出を達成するための手段を提供する。本発明においては、標的核酸が極めて低濃度で存在する場合に高感度のアッセイが可能であるということが特に有利である。更に、本発明の試験片は容易に製造されかつ有意の製造上の有効性を有する。プローブが水不溶性粒子から構成されているので、それらは後の使用のために、適切な支持体上に容易に付着されるか又は試験具中に包含される。従って、プローブ溶液の使用及びそれに伴う不利益が回避される。

この利点は、支持体上の特定位置において支持体に付着している水不溶性プローブを使用することにより達成される。更に、このプローブは当該技術分野において教示されているようには、支持体内に埋め込まれてはいないので、プローブのより多くの表面積が被検体に露され、従ってアッセイ感度が高められる。本発明の重要な利点は、個々の位置において支持体に付着した複数個の水不溶性プローブを使用して、複

に左右される。このオリゴヌクレオチドは合成により又はクロニングにより誘導されてもよい。

用語“プライマー”は、天然に存在するにせよ合成により製造されるにせよ、核酸鎖に対して相補的なプライマーのエクステンション産物の合成が誘発される条件に付された際に、合成に開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを指す。このような条件としては、ヌクレオチド（例えば、4本鎖のデオキシリボヌクレオチド三リン酸）及び重合剤、例えば、DNAポリメラーゼの存在、並びに適切な温度及びpHが挙げられる。

一実施態様においては、このプライマーは1本鎖領域に隣接した、2本鎖の標識化核酸領域を含む。この1本鎖領域は、核酸配列を含み、この核酸配列はそれとハイブリッド形成する鋳型鎖に対して十分に相補的である。このプライマーの2本鎖領域、又は尾部を、検出可能なシグナルを発生させることができるか又はそのエクステンション産物を捕捉もしくは固定化するのに有用な検出可能な部分で標識化することができる。

他のそして好ましい実施態様において、プライマーは全体的に一本鎖である。好ましくは、プライマーは1本鎖のオリゴデオキシリボヌクレオチドである。それは、重合剤の存在下でエクステンション産物の合成を開始させるのに十分な長さでなければならないが、その正確な大きさは、意図する用途、標的配列の複雑さ、反応温度及びプライマー源次第で変動するであろう。一般に、本発明に用いられる各プライマー

は約15〜約50個のヌクレオチドを、好ましくは約20〜約30個のヌクレオチドを有するであろう。

本発明において用いられるプライマーは、増幅されるべき各特定配列の各種鎖に対して“実質的に”相補的であるように選択される。このことは、それらが、それらの各鎖とハイブリッド形成して所望のハイブリッド形成化産物を形成するのに十分なほど相補的でなければならないということを意味する。非相補性塩基は、それらがハイブリッド形成及びエクステンション産物の形成を阻害しない限り、その中に含まれていてもよい。プライマーは、増幅効率において最良の結果が得られるように確かな相補性を有することが好ましい。

本明細書において有用なプライマーは、多くの原料から得ることができ、又は、例えば、ABI DNA 合成機（アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)から入手可能）もしくはSAM-I 合成機（バイオサーチ・インコーポレイティッド(Biosearch, Inc.) から入手可能）をはじめとする公知技法及び装置並びにそれらを使用するための公知方法を用いて製造することができる。生物学的原料から単離される、天然に存在するプライマーもまた有用である（例えば、制限エンドヌクレアーゼ消化物）。

本明細書において用いられるものとして、用語“プローブ”は天然に存在する又は合成により製造されるオリゴヌクレオチドを指し、これはプライマーとしては使用されないが、しかしハイブリッド形成化産物を形成するように核酸の1種又はそれ以上の配列に対して実質的に相補的であるように設計

の水不溶性粒子からなるので、水不溶性である。このオリゴヌクレオチドは、それらが分析の過程でハイブリッド形成化産物を形成するのに十分な程度まで、問題の核酸に対して相補的である。

本試験片についてここで更に詳細に検討するが、しかし更なる実施態様は当業者にとって容易に明らかになるであろうことが理解されるべきである。

試験片の支持体は、プローブを容易に付着させることができかつ所定の核酸を含む溶液がプローブに容易に接近することが可能であるような、任意の多孔質面又は非多孔質面であってよい。製造及び保存の際、及びある場合には分析の際、プローブを適所に保持するためには、プローブと無機質間にあるタイプの結合が存在しなければならない。しかしながら、試験片の使用の際に望まれる感度にとっては、支持体が多孔質であろうと又は非多孔質であろうと、プローブが圧倒的に支持体の外側面（又は表面）上に存在するということが重要である。このことは、プローブがかなりの程度まで支持体中に埋め込まれていないことを意味する。多孔質支持体を用いる試験片の製造の過程では、プローブのあるものは支持体内に埋め込まれるかもしれないが、しかし本発明においては、20%未満のプローブがそのような状態に置かれることが予測される。好ましい実施態様においては、支持体は非多孔質物質であり、かつ1種又はそれ以上のプローブが1個又はそれ以上の外側面上に完全な形で存在する。

されている。更に、プローブは一般に得られるハイブリッド形成化産物の“捕捉(capture)”または“検出(detection)”のいずれかのために設計されている。捕捉プローブは、例えば、特定の結合リガンド（例えば、アビジン-ビオチン複合体）を介して吸収又は複合化することにより、ある形で不溶性物質に結合されるか、または分析中のある時点で結合されるようになることができるものである。検出プローブはその中に検出可能な標識を包含せしめているか、又は検出可能な部分と、例えば、アビジン-ビオチン複合体を介して反応することができる部分を有する。捕捉プローブ及び検出プローブの他の具体例は当該技術分野において公知である。

本発明は、同一の又は異なる被検体中に存在する1種又はそれ以上の所定の核酸の検出に向けられている。かかる被検体としては細胞質もしくはウィルス性物質、毛髪、体液、又は検出可能な遺伝子ウィルスもしくは細菌 DNA もしくは RNA を含む他の物質を挙げることができる。かかる検出の主な目的は事実上は、診断ということであろうが、本発明はまた、組織の分類のための、又は化学的合成から得られる核酸の混合物から所望の核酸を大量に得るための、DNA又はメッセンジャーRNAのクローニングの効率を改良するのにも用いることができるであろう。

本発明は、適切な方法で1種又はそれ以上の捕捉プローブが付着している支持体を有する試験片を用いて行うのが有利である。各プローブは、1種又はそれ以上のオリゴヌクレオチド分子を共有結合でそれに付着せしめている、あるタイプ

支持体は、少くとも2つの対向外側面を有する形状（下記）を有するものとして更に明瞭に定義される。かかる表面は一般に平行であるが、しかし完全に平行である必要はない（例えば、試験管のカーブした底部の内側面及び外側面）。一般に、支持体は、プローブを保持するための僅少の厚さ及び外側面を有する平坦なシート、膜又はフィルムである。試験片の一実施態様の詳細な記載は同時係属米国特許出願第339,923号(Schnipelsky等により1989年4月17日出願)明細書に与えられている。

本明細書中において有用な支持体材料としては、フィルム、膜、箔、紙（例えば、いかなる方法でも処理、仕上げ、サイジング又は被覆されていない原料素材紙をはじめとする写真用又は感熱印刷用紙、又は例えばポリマーラテックスで処理、仕上げ、サイジング又は被覆された紙）、キューベツト、試験管、試験スライドもしくは試験細片をはじめとする、任意の有用な形に形状化されたセルロース性物質、金属、ポリマー、セラミックス、ガラス又は繊維が挙げられるが、これらに限定されるものではない。特に有用な支持体としては、ポリマー性フィルム、ポリマー性もしくはセルロース性微孔性膜、例えば、ポール・コーポレーション(Pall Corp.)製のもの（例えば、Biodyne(商標)又はLoprodyn(商標)膜）、又はポリマーラテックス被覆、もしくは非被覆セルロース紙が挙げられる。最も有用な支持体は、実質的に非多孔質のかつ被覆された紙、例えば、感熱印刷用紙である。

試験具のいくつかの実施態様が、添付図面に示されている。

第1図及び第2図を見ると、試験具10は、上部及び下部対向面14及び16を有する、単一片のポリマーフィルム支持体として示されている。水不溶性核酸プローブ18は、支持体12の対向面14の中心に付着物として固定される。

試験具の別の実施態様は、第3図の断面図に示されている。試験具20は、上部及び下部対向面24及び26を有する多孔質支持体22を含んでなる。水不溶性プローブ付着物28、30及び32は対向面24の区隔域に位置し、これらは同一の又は異なるプローブを含有することができる。

更に別の実施態様は、第4図の断面図に示された使い捨て試験具(下記)の試験ウェルである。試験ウェル40は、円錐状の壁42及びその底部に多孔質膜46を有する。膜46は対向する上部面及び下部面48及び50を有し、対向面48上には水不溶性プローブ付着物52を有する。

プローブは支持体上に任意の適切な技法を用いて付着させることができる。一般に、プローブを適切な方法で付着させそして乾燥させて、支持体上にプローブの塗布域を形成し、そして付着は物理的手段による。あるいは、望ましいならば、支持体及びプローブのいずれかのもしくは両者上の反応性基を用いる化学反応を介して、又は反応性連結基を介して、付着させることができる。プローブは、支持体の1個又はそれ以上の区隔域(例えば、点、細片又は他のパターン、各々の区隔域は一般に約1〜約30mm²の表面積を有する)において単に乾燥されるだけであるのが好ましい。ある場合には、プローブはアッセイに用いられる液体と接触した際、再懸濁さ

れてもよい。

プローブそれ自身は、規則的な又は不規則的な形状の水不溶性粒子を用いて製造される。円形の場合は、それらは一般に約0.1〜約10 μ mの平均直径を有する。好ましくは、粒子は円形でありかつ約5 μ m未満の平均直径を有する。粒子は、ガラス、セラミックス、金属、磁性材料、ポリマー材料、ゾル、ゲル及び当業者に容易にわかる他の材料(それらに限定されないが)をはじめとする、オリゴヌクレオチドが共有結合で結合することができる適切な材料から製造することができる。好ましくは、粒子は、共有結合によるオリゴヌクレオチドの結合のための活性基を有するポリマーから製造される。有用な活性基としては、カルボキシ、アミノ、スルヒドリル、アルデヒド、活性化2-置換エチルスルホン、ビニルスルホン、活性ハロゲン原子、ニトロアリアル及び当業者に容易にわかる他のものが挙げられる。特に有用な粒子は、次の反応性基:カルボキシ、活性化2-置換エチルスルホン、ビニルスルホン又は活性ハロゲンを1個又はそれ以上有するエチレン性不飽和重合性モノマーの1種又はそれ以上から誘導されるポリマー性粒子である。有用なモノマー、それらの製造方法及びオリゴヌクレオチドの結合をはじめとする、このような粒子についての更に詳細なことは当該技術分野において知られている(例えば、1989年2月8日公告されたヨーロッパ特許第0302715号明細書中に)。

オリゴヌクレオチドの粒子への結合は、標準操作を用いて達成することができるが、粒子のタイプ(すなわち、反応性

基)及びオリゴヌクレオチドのどの反応性基が用いられるか(例えば、ピリミジンもしくはプリン塩基部分上の反応性基、又は末端ヌクレオチドの部分、5'又は3')に依存するであろう。種々の操作が例えば、国際公開第88/01302号(前記)明細書に記載されている。

オリゴヌクレオチドの粒子上への被覆量はある種のアッセイにおいては感度を改善するために重要であるかもしれない。一般には、粒子上にできるだけ多くのオリゴヌクレオチド分子を結合させることが望ましい。粒子は他の支持体と比較して、体積に対する表面積比が高いので、高密度が有利である。好ましくは、被覆量は一般に粒子1mg当たり約100〜約3000ピコモル(pmol)のオリゴヌクレオチドである。

上記したように、水不溶性プローブを、支持体の1個又はそれ以上の表面の区隔域に付着させる。各区域の大きさ及び形状は同一であっても又は異っていてもよい。同一の又は異なるプローブを有する複数個の区隔域が存在する、好ましい実施態様においては、これらの区域は各区域を別々に検出できるように十分に離して保持される。この実施態様においては、同一又は異なる被検体から種々の所定の核酸を検出するために、様々なプローブを使用することができるし、又それらは同一の核酸を検出するためにしかし対照として役立てるだけに使用することができる。

本発明は、また所定の核酸を検出するための、本明細書中に記載された試験片の使用法も包含する。前記方法の一般的な記述は上記されている。一実施態様においては、この試

験片は、得られた3部分ハイブリッドの検出を行うために第2のプローブを使用するサンドウィッチ・ハイブリッド形成アッセイにおいて使用される。この第2プローブもまた所定の核酸と相補的であり、かつある方法(上に検討したように)で検出を可能にする1つの部分を含有する。好ましくは、第2プローブはアビジン、ビオチン、抗体、抗原、ハプテン、レクチン、糖(又は別の特異的結合部分)、又は後述の他の検出可能な部分で標識化される。最も好ましくは、標識は酵素であり、酵素は適切な基質又は色素形成性試薬と接触すると試験片上に検出可能な色素を生じるであろう。

標識を結合させそしてプローブを製造する操作は、例えば、Agrawal等による、Nucleic Acid Res. 14巻、6227-45頁(1986年)に記載されているように、当該技術分野において周知である。有用な標識としては、放射線同位体、高電子密度試薬、色原体、フルオロゲン(蛍光増強剤)、蛍光性部分、着色粒子、フェリチン並びに他の磁性粒子、化学ルミネッセンス性部分、及び酵素が挙げられる。有用な酵素としてはグルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ウリカーゼ、アルカリ性ホスファターゼ及び他の当該技術分野において公知のものが挙げられる。かかる酵素についての基質及び色素形成性組成物は周知である。

特に好ましい実施態様においては、標識はペルオキシダーゼであり、分析のある時点で過酸化水素及び適切な色素形成性組成物を添加して検出可能な色素を生じさせる。例えば、有用な色素-生成試薬としては、テトラメチルベンジジン及

びその誘導体、並びにロイコ染料、例えば、トリアリールイミダゾールロイコ染料(Bruschiに対して1978年5月16日に発行された米国特許第 4,089,747号明細書に記載されているような)、又は反応してペロキシダーゼ及び過酸化水素の存在下で色素を生じる他の化合物が挙げられる。特に有用な色素-生成組成物は以下の例に記載されている。

得られたハイブリッド形成生成物中にあるプローブの存在の検出は、適切かつ公知の検出装置及び操作を用いて達成することができる。あるプローブは検出装置を使用することなく目視で見えるかもしれない。この方法を適切な容器(下記)の中で行うのもまた有用である。

上記のような、所定の核酸のプローブとのハイブリッド形成に先立って、所定の核酸を増幅して、検出に用いることができる分子数を増加させることが好ましい。

米国特許第 4,683,202号(前記)明細書に更に詳細に記載されているように、増幅は、含まれる反応の工程の数に対して指數的量の少なくとも1種の所定核酸を生成するための連鎖反応を包含する。この産物は、用いた特定プライマーの末端に対応する末端との別個の核酸重複物であるだろう。精製されていてもいなくても、任意の核酸原料を、もしそれが検出の標的である核酸を含有するか又は含有すると推定されるならば、出発原料として利用することができる。望ましい場合には、核酸混合物を用いることができる。所定の核酸はフラグメントであっても又は完全な酸であってもよい。更に、増幅されるべき各核酸について特異的な一組のプライマー及びブ

を導入する。この誘発剤は重合剤として当該技術分野において一般に知られている。これらの産物を形成する反応は公知の条件(一般に、室温から、重合がもはやおこらない温度まで)下で行われる。

一実施態様においては、用いるプライマーは標識化されず、かつ増幅産物の検出は、エクステンション産物を形成するための、1種又はそれ以上の放射線標識化デオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いて達成される。

重合剤は、プライマーエクステンション産物の合成を達成するように機能するであろう、任意の試薬、又は試薬の組合せであってもよく、酵素(例えば、大腸菌 DNAポリメラーゼ I、T4 DNAポリメラーゼ、クレノウポリメラーゼ、逆転写酵素及び当該技術分野において公知の他のもの)が挙げられる。特に有用な酵素は、クローニングされたもの又は天然に存在するもので熱安定性酵素、例えば、種々のサーマス(Thermus)属の細菌種である。他の重合剤は米国特許第 4,683,202号(前述)明細書に記載されている。

好ましい熱安定性酵素は、サーマス・アクアティカス(*Thermus aquaticus*)から単離された又はそのゲノムから単離された DNAポリメラーゼ、例えばヨーロッパ特許公開第 0258017号(1988年3月2日公開)公報に記載されているものである。他の有用な酵素はRossi 等による、*Syst. Appl. Microbiol.*, 7(2~3), 337~341頁、1986年に記載されている。多くの有用なポリメラーゼが市販されている。一般に、エクステンション産物の合成は各プライマーの3'末端

ローブを用いることにより、1種以上の核酸を同時に増幅することができる。

本発明は、2本の相補的鎖を有する核酸の検出に有用である。すでに問題となっている核酸の大部分は、DNAにおいて見出されるもののように2本鎖である。しかしながら、1本鎖核酸、例えば、mRNAは、逆転写酵素を用いてそれを2本鎖配列に転化した後に、同様に検出することができる。

複製されるべき特定の核酸は鋳型として使用される。もしこの酸が2本鎖を含むならば、別の工程として又はプライマーのエクステンション産物の形成と同時に、鎖の分離(変性と呼ぶ)を行う必要がある。変性は、先行技術に記載されているような、任意の適切な物理的、化学的又は酵素的手段を用いて達成することができる。適切な温度まで加熱することが好ましい手段である。

分離された鎖が使用できるようになれば、追加の核酸鎖の合成は、2種又はそれ以上のプライマー(そのうちの少なくとも1種は上記のように標識化されている)を用いて、緩衝水溶液中で約7~約9のpHで行うことができる。好ましくは、過剰のモル濃度で、2種のプライマーを緩衝溶液に添加するが、具体的な量は先行技術において教示されている。デオキシリボヌクレオチド三リン酸dATP, dCTP, dGTP及びdTTPもまた、合成混合物に適量添加し、そして得られた溶液を約90~100℃まで10分間、好ましくは約1~約4分間加熱する。この加熱後、この溶液を好ましくは室温まで冷却し、次いでプライマーエクステンション産物の形成を誘発するための適切な剤

で開始しそして合成が終了するまで鋳型に沿って5'から3'方向へ進行する。ある重合剤(例えば、逆転写酵素)は鋳型に沿って3'から5'方向へ進行するかもしれない。

新規に合成された鎖及びそれらの各々のプライマーを含んでなる新規に形成されたプライマーエクステンション産物は、この方法の次の工程において用いられる初期標的鎖と2本鎖分子を形成する。これらの鎖は次に変性により分離されて1本鎖分子を生成し、上述したように、この1本鎖上に新しい核酸が合成される。増幅操作の進行を続けるためには更なる試薬を必要とするかもしれない、この後ほとんどのエクステンション産物は、2個のプライマー(すなわち、相補的産物としての)とハイブリッド形成された所定の核酸からなるであろう。

鎖分離及びエクステンション産物合成の工程は必要なだけ繰り返されて、検出に必要な所望量の所定の核酸を生成する。一般に、一連の工程は少なくとも1回、好ましくは少なくとも10~30回繰り返される。

少なくとも1個のプライマーエクステンション産物の発生の後の、本発明方法における任意の時点で、エクステンション産物は、本明細書において記載したような、捕捉プローブ又は検出可能な標識化プローブのいずれかのプローブとハイブリッド形成することができる。プローブとエクステンション産物とのこの接触は、この分析中の他のハイブリッド形成反応と同時に又は引き続いておこなうことができる。

この増幅方法は適切な容器中で行うことも有用である。最

も簡単な容器は試験管、フラスコ又はビーカーであるが、しかし更に精巧な容器が自動操作を容易にするために造られてきた。例えば、この方法を実施する際にある温度特性を与えるように構成されたキューベットが米国特許出願第 273,781号 (Burdick等により1987年11月21日出願) 明細書に記載されている。この方法を遂行するための、そして本発明の試験片を包含する特に有用な容器が米国特許出願第 339,923号 (上記) 明細書に記載されている。他の有用な容器は、本発明方法の自動による使用又は手動による使用のために適宜作成することができるであろう。

検出されるべき相補的産物にとっては、水不溶性産物が反応媒体中で非固定化物質から分離されることは重要である。このことは、濾過、洗浄、遠心又は他の適切な分離技法により行うことができる。

特に有用な分離手段は、微孔質の濾過膜、例えば、Pall Corp.により市販されているポリアミド膜 (例えば、Loprodyne™ (商標) 又は Biodyne™ (商標) 膜) である。それらは、界面活性剤もしくは分析操作を容易にする他の物質で被覆されずに用いられても又は予め被覆されて用いられてもよい。一実施態様においては、検出方法が行われるキューベット中に膜をとり込んでいる。一般に、かかる膜は実質的にすべてのプローブがその表面上に残留するような平均孔寸法を有する。好ましくは、この孔寸法は約1〜約10 μ mである。

膜は、分析の他の工程を実施するための適切な容器を有する別の支持体として使用することができる。しかしながら、

好ましくは、膜は使い捨て試験片の一部としてとり付けられる。様々な試験片が米国特許第3,825,410 (Bagshaweに対して1974年7月23日発行)、米国特許第 3,888,629号 (Bagshaweに対して1975年6月10日発行)、米国特許第 3,970,429号 (Udike に対して1976年7月20日発行) 及び米国特許第

4,446,232号 (Liottaに対して1984年5月1日発行) 明細書に記載されているようなものをはじめとする従来技術において公知である。特に有用な試験片は米国特許出願第98,248号 (Hinckley 等により1987年9月18日出願) 及び米国特許出願第 339,923号 (上述) 明細書に記載されている。微孔質膜を含む有用な使い捨て試験片はEastman Kodak Company により Surecell™ (商標) 試験片として市販されている。

本明細書に記載された方法は、感染性疾病、遺伝性障害又は癌のような細胞障害と関連した、所定の核酸の検出又は特性決定を行うのに使用することができる。この方法はまた法医学的研究及び DNA組織の類型化にも使用される。本発明の目的のためには、遺伝的疾患としては任意の生体由来の染色体 DNAの特異的欠失又は突然変異、例えば鎌状赤血球細胞貧血、囊胞性線維症、 α -サラセミア、 β -サラセミア及び当該技術分野における当業者に容易に明らかである他のものが挙げられる。様々な感染性疾病は、臨床サンプル中の少量の、生体 (それが酵母、バクテリア又はウィルスのいずれであっても) 特有の特異的 DNA配列の存在により診断することができる。検出可能なこのようなバクテリアとしては、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)、サルモネラ (*Salmonella*)、ク

ラミジア (*Chlamydia*)、 gonoreia (*Gonorrhea*)、シゲラ (*Shigella*) 及びリステリア (*Listeria*) が挙げられるが、しかしこれらに限定されない。検出可能なウィルスとしてはヘルペス、風疹、ヒト乳頭腫ウィルス、サイトメガロウィルス、エプスタインバールウィルス、肝炎、HTLV-I及びHIV-Iのようなレトロウィルスが挙げられるがこれらに限定されない。鎌状赤血球細胞貧血の診断のための β -グロビン DNAの検出もまた本発明を用いて遂行することもできる。他の検出可能種は当業者には容易に明らかであろう。本発明は、試験試料中の、レトロウィルス、例えば、HIV-Iの存在の検出に特に有用である。かかるアッセイにおいては、HIV-I DNAの核酸配列、例えば、ギャグ(gag)域の配列に対して相補的なオリゴヌクレオチドを有するプローブを使用する。

次の例は本発明の実施を具体的に説明するために提供されるものであり、本発明を限定するものではない。すべてのパーセントは他に断らない限り重量パーセントである。

例1及び例2は、フロー、スルー(flow through)操作と云われるものを用いる、HIV-I DNAの分析を具体的に説明するものであり、この操作により水不溶性プローブを使い捨て試験片中のフィルター膜上に固定化するものである。HIV-I DNA標的核酸とのハイブリッド形成がおこって水不溶性産物を形成し、続いてフィルター膜を介して水溶性物質を洗浄する。膜上に残留する水不溶性産物をその表面上で検出する。

例3はフロー、バイ(flow by)操作と云われるものを用いるHIV-I DNA及び β -グロビン DNAの分析として具体的に説

明するものであり、この操作により2種の水不溶性プローブを、多孔性を実質的に全く有さない固体上基板上に固定化する。HIV-I DNA及び β -グロビン DNA標的核酸とのプローブのハイブリッド形成がおこって水不溶性産物を形成する。水溶性物質は支持体から洗い流されそして残留する水不溶性ハイブリッド産物が次に支持体表面上で検出される。

例1: HIV-I DNA フラグメントの検出における核酸試験片の製造及びその使用

材料:

2-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニル)-4,5-ビス(4-メトキシフェニル)イミダゾールを含有するロイコ染料溶液を次のように調製した:

固体状ロイコ染料(0.1%溶液を調製するように)を、リン酸ナトリウム緩衝液(5ミリモル濃度)中の20重量%のポリ(ビニルピロリドン)溶液に溶解した。この溶液を次に、リン酸ナトリウム緩衝液中に過酸化水素(10ミリモル濃度)、4'-ヒドロキシアセトアニリド電子移動剤(5ミリモル濃度)及びジエチレントリアミン五酢酸キレート剤(10 μ モル濃度)を含有する溶液に添加して、10%のポリ(ビニルピロリドン)及び0.005%のロイコ染料の最終濃度とした。

カゼインを同重量のコハク酸無水物と4時間25℃で反応させ、次に透析により生成物を精製することによりコハク酸エステル化カゼインを製造した。

この例において検出された所定の DNAフラグメントをM13ベクターの誘導体にクローニングされかつ標準操作を用いて

調製されたHIV-I ゲノムのgag域(コア蛋白)の180ヌクレオチドセグメントであった。

所定の DNAの増幅に用いられたプライマーは、アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)及びチトシン(C)という標準的な省略を用いると次のヌクレオチド配列を有した:

5' -X-TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAAATGC-3' 及び

5' -ATAATCCACCTATCCAGTAGGAGAAAT-3'

前記式中、Xは、引用することにより本明細書中に包含されている、国際公開第89/02931号明細書中に記載されている操作により調製されかつ結合されたビオチンテトラエチレングリコール分子を表す。

DNAポリメラーゼをサーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) から、ヨーロッパ特許公開第 0258017号公報に記載されている操作(1単位は、プライマー・エクステンション産物中に30分間37℃で包含された dNTP 10ミリモルに相当する)に従って単離した。

ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体をZymed Labs (サンフランシスコ) から得、そしてカゼイン(0.5%)、3-(N-モルホリノ)-プロパンスルホン酸緩衝液(100ミリモル濃度、pH7.5)及び保存剤(0.01%)を含有するリン酸緩衝液で1:8000に希釈した。最終の複合体濃度は156ng/mlであった。リン酸緩衝液はリン酸ナトリウム(25ミリモル濃度、pH7.3)及び塩化ナトリウム(75ミリモノ濃度)を含有した。

た:

プローブA: 334 ピコモルのプローブ/ng粒子、

プローブB: 835 ピコモルのプローブ/ng粒子、

及び

プローブC: 1670ピコモルのプローブ/ng粒子。

上記の水不溶性プローブ(0.45%懸濁物1ml)を、Surecell™(商標名)使い捨て試験具(Eastman Kodak Co.)の試験ウェル中に位置するいくつかの多孔質膜(Biodyne™、商標名、1g/mlのコハク酸エステル化カゼインを被覆したナイロン膜)の各々の規定区域(約2mm²未満)中に付着させた。このプローブ懸濁物を約30分室温で乾燥させた。次に、得られた試験片を以下に述べるアッセイに使用した。

アッセイ操作:

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液(10ミリモル濃度、pH8)、塩化カリウム(50ミリモル濃度)、塩化マグネシウム(10ミリモル濃度)及びゼラチン(10mg)を含有する緩衝液に、上記プライマー(各々100pmole)、dNTP(各々1.5ミリモル濃度)、上記ポリメラーゼ(7.5単位)及びヒト胎盤DNA(Sigma、1mg)を添加した。更に、上記DNA標的(10⁻¹⁰モル濃度)を添加したが、全量は100ngであった。

標的としてβ-グロビン遺伝子を含むヒト胎盤DNA(10mg/ml)、及び当該技術分野において公知の、β-グロビンDNAに対して特異的であり、その1つのプライマーはビオチン化されている適切なプライマーを含有する対照(100ng)を調製した。

プローブの調製:

例に使用された水不溶性プローブは次の方法で調製した。

ポリマー粒子(2μm)は、標準ラテックス重合操作を用いてポリ(スチレン-コ-アクリル酸)(97.5:2.5モル濃度比)から構成されており、次にグリシン緩衝液(0.1モル濃度、pH8.5)中に懸濁物(0.45%固体)として保存した。

所定のHIV-I DNA 標的配列に対し相補的なオリゴヌクレオチドを用いてプローブを調製した。このプローブは次の配列を有した:

5' -X-ATCCTGGGATTAATAAATAAGTAAGAATGT-3'

前記式中、Xは、引用することにより本明細書中に包含されている、国際公開第89/02932号明細書に記載されているような、ポリエチレングリコールスパーサーを介してプローブに結合したアミノ基を表す。

ポリマー粒子の懸濁物を2回、2-(N-モルホリン)エタンスルホン酸緩衝液(0.1モル濃度、pH6)で洗浄した。2-(N-モルホリン)エタンスルホン酸緩衝液(1ml)中の粒子試料(30μm)を1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(同一の緩衝液中に100mg/mlの濃度のもの0.15ml)及び前記オリゴヌクレオチド(57.300/mlのナノ純度の水0.0288ml、1.6500単位)と混合した。得られた混合物を回転しながら20~25℃で15時間回転し、遠心分離し次いで粒子を3回ナノ純度水で洗浄し次いでその中に再懸濁(0.45%固体)した。

得られた水不溶性プローブを、3つの異なる濃度に調製し

上記の各溶液をポリプロピレン製微量遠心分離管中に入れ、プライマーエクステンション産物を形成し、ついで増幅を次のように30連続熱サイクルを用いて促進した。

70℃から95℃まで昇温	1分
95℃	0.5分(変性)
95℃から55℃まで降温	1.25分
55℃	0.5分(ハイブリッド形成)
55℃から70℃まで昇温	0.75分
70℃	1分(エクステンション)

30熱サイクルによる増幅の後、各混合物の5μl分別量を、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液(10ミリモル濃度、pH8)、塩化カリウム(50ミリモル濃度)、塩化マグネシウム(10ミリモル濃度)及びゼラチン(1mg/10ml溶液)を含有する溶液に添加し、熱変性し(95℃で5分間)、次に上記したSurecell™(商標)試験具の試験ウェルに添加した(各ウェル中に各溶液を約95μl)。

テープを各ウェル上にかぶせてそれらを密封し、次いで試験具を42℃で5分間インキュベートして、増幅HIV-I DNA フラグメントを試験ウェル中に固定化された水不溶性プローブにハイブリッド形成された。テープを次に各試験ウェルから取りはずし、次にリン酸緩衝液(10ミリモル濃度、pH7.4)、塩化ナトリウム(150ミリモル濃度)、エチレンジアミン四酢酸(1ミリモル濃度及びデシル硫酸ナトリウム(1%)を含有する緩衝液(250μl)を用いて55℃で洗浄した。

上記ペルオキシダーゼ複合体(50μl、7.8ng)を各試験ウ

ェルに添加し、次いで試験具を室温で2分間インキュベートした。上記緩衝液を用いて第2回目の洗浄(250 μ l)を行った。ロイコ染料溶液(100 μ l)を各試験ウェルに添加し、続いて室温で2分間更にインキュベートした。結果としておこる色素形成反応をナトリウムアジド(0.1%のものを100 μ l)を添加することにより停止し、次いで得られた色素を膜上で観察した。

結果を目視により、ゼロは濃度なし及び5は最高濃度であるとした0~5のスケールを用いて等級づけした。次表の結果は、各プローブ濃度について2回別々に読取ったものの平均である。

対照溶液を添加した試験具ではシグナルは全く観察されなかった。バックグラウンド値は水不溶性プローブが存在しない膜上の区域での濃度読取りから得られた。

プローブ試験	色 素 濃 度	
	試験試料	バックグラウンド
プローブA	3.65	0.25
プローブB	3.5	0
プローブC	3.35	0

例2: HIV-I DNA の検出

本例は、プローブをその上に固定化した基板として微孔質濾過膜を用いる、HIV-I DNA 検出を実証するものである。

0.45%の固体含有量になるように再懸濁した。

グリシン緩衝液中の粒子懸濁物(15ml、0.0045g/ml)を遠心分離し、次いでこのペレットを2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸緩衝液(0.1モル濃度、pH6)中に再懸濁した。この操作を2回繰り返して次いで得られたペレットを、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(同一の緩衝液中に100mg/mlの溶液を0.338ml)及び以下の配列を有するオリゴヌクレオチド(5.73 OD/mlの緩衝溶液0.654 μ l)と混合した。この懸濁物を回転させながら16時間室温で回転させ次いで遠心分離にかけ、そしてペレットをナノ純度の水(15ml)中に再懸濁した。この遠心分離操作を3回繰り返し、次いで得られたペレットを水に懸濁させて水不溶性プローブの0.45%固体含有の懸濁物を得た。

このオリゴヌクレオチドは次の配列(塩基について標準の省略形を用いて)を有した:

5'-ATCCTGGGATTAAATAAATAGTAAGAATGT-3'

アッセイ:

HIV-I DNA のアッセイは、例1に記載した操作に従って行った。水不溶性プローブを微孔質膜の規定区域中に付着させ次いで例1において述べたように乾燥させた。

アッセイ中に膜上に生成された色素量は目視により0~5のスケールを用いて等級づけした(ゼロは濃度なし及び5は最高濃度である)。バックグラウンド値は水不溶性プローブが存在しない膜域上の濃度読取りから得られた。この分析についての色素濃度の読取りは約4.8と測定され、一方バック

材料及び方法:

ポリ[スチレン-co-m及び p - (2-クロロエチルスルホニルメチル)スチレン](95.5:4.5モル濃度比、2.2 μ mの平均寸法)を含んでなるポリマー粒子を、引用することにより本明細書中に包含されている米国特許出願第081,206号(Sutton等により1987年8月3日出願)明細書に記載されている方法により製造した。

カゼインをこれらの粒子に次の方法で結合した:カゼイン(Sigma Chemical、0.05モル濃度のホウ酸塩緩衝液中に2.57mg/mlのものを4.94ml、pH8.5)、メチロサル(0.01%)及び上記のポリマー粒子の懸濁物(ホウ酸塩緩衝液中に17.7ml、0.0637g/ml)の溶液を回転させながら16時間室温で回転させた。この混合物を次に遠心分離にかけ次いで緩衝液を除去した。得られたペレットをグリシン緩衝液(0.1モル濃度、50ml、pH8.5)及びメチロサル(0.01%)中に再懸濁した。この混合物を遠心分離にかけ、次いで得られたペレットを0.45%の固体含有量になるようにグリシン緩衝液(250ml)中に再懸濁した。

粒子2.54gを含有する粒子懸濁物(50ml)の試料を3回ホウ酸塩緩衝液(10ml、0.05モル濃度、pH8.5)で洗浄し、ジメチルスルホキシドの溶液(10mg/ml)中のコハク酸無水物(Sigma Chemical、0.762ml)と混合し次いで4時間室温で反応させた。この混合物を遠心分離にかけ次いで溶液を除去した。得られたペレットを3回グリシン緩衝液(50ml、0.01モル濃度、pH8.5)で洗浄し、次いでグリシン緩衝液中で

グラウンド濃度は約0.5であった。

例3: HIV-I DNA 及び β -グロブリン DNAの測定

本例は、2つの水不溶性プローブがその上に固定化されている基材として、実質的に非多孔質の、非被覆紙を用いる、HIV-I DNA 及び β -グロブリン DNAについてのアッセイを実証するものである。

材料:

エッペンドルフ(Eppendorf)管及びヒーターをEppendorf Corporation から得た。

Bktamate™ (商標)感熱印刷紙(非被覆)をEastman Kodak Company から得て、実質的に非多孔質の非被覆紙基板として使用した。

HIV-I プライマーは、上記例1において記載したものと同じであった。

β -グロブリン DNAプライマーは次の配列を有した:

5'-X-ACACAAGTGTGTTCACTAGC-3' 及び

5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'

上記式中、Xは、HIV-I プライマーについて例1において述べたようにして製造しかつ結合させたビオチン分子である。

β -グロブリン DNAプローブは次の配列を有した:

5'-X-CTCAACAGACACCATGGTGCACCTGACTC-3'

前記式中、XはHIV-I DNA プローブについて述べたものと同じである。

プローブ及びプライマーは標準ホスホアミダイト化学を用いて製造し、高圧液体クロマトグラフィーにより精製しそして

標準配列操作により特性決定された。

HIV-I DNA についての水不溶性プローブは上記例1において述べたように、ポリ(スチレン-コ-アクリル酸)(95:5モル濃度比、2 μ m)からなる粒子を用いて製造した。このプローブ(0.45%の懸濁液2 μ l)をEktamate™(商標)感熱印刷紙(大きさが約19×8mm)の規定区域(直径2mmの点)上に付着させ、室温で乾燥させた。 β -グロブリンプローブDNAを同様に調製しそして同一の紙基材の別の区域(直径2mm)に付着させた。

この紙支持体を次にプラスチック材(ポリエステルとポリエチレン又はポリプロピレンのいずれかとの積層層)の一方の面に貼り付けた。プラスチック材の他の面を第1の面上に熱を用いてシールして囲りをとじたパウチを形成した。このパウチは、その中のプローブとのおこり得る接触のために、液体をパウチ内に注入するための流入ビベット口、及び液体をパウチから流出させる流出手段を含有した。流体試薬を次にパウチ内に入れてプローブと接触させてその後パウチから流出させた。

ポリメラーゼ連鎖反応のための反応混合物(全容量100 μ l)は:

- トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液(10ミリモル濃度、pH8.3)、
- 塩化カリウム(50ミリモル濃度)、
- 塩化マグネシウム(10ミリモル濃度)、
- dNTPs(各々1.5ミリモル濃度)、

を変性した。この加熱溶液をビベットに移し、次いでプローブを固定化せしめている感熱印刷紙の表面のおおいを確保するような方法で、上記パウチ中へ注入した。このパウチを次に42℃で5分間インキュベートして、対応するプローブをそれぞれの1本鎖HIV-I及び β -グロブリンの核酸標的に結合させた。液体を空気圧で押し出すか又は液体を注射器を用いて吸い出すことによりパウチから液体を除去した。

洗浄溶液をパウチ中へ2回注入した。この溶液は、リン酸二水素ナトリウム(10ミリモル濃度、pH7.4)、塩化ナトリウム(150ミリモル濃度)及びエチレンジアミン四酢酸(1ミリモル濃度)を含んでなる緩衝溶液250 μ l、並びにデシルサルフェート(1%)からなり、55℃まで予備加熱した。第2回目の洗浄後、液体を除去し、次いで例1のストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体(200 μ l)を次にパウチ中に注入し、これを次に室温で2分間インキュベートした。この液体を次に除去し、次いで上記のロイコ染料溶液(200 μ l)をパウチ中に注入し、続いて室温で1~2分間更にインキュベートした。最後にこの液体を除去した。アジ化ナトリウムの溶液(0.1%溶液200 μ l)をパウチ中に注入して反応を停止し次いで感熱印刷紙上にある色素を目視により、5が最高色素濃度を表す、0~5までのスケールを用いて等級づけした。バックグラウンドは、プローブを固定化していない感熱印刷紙の区域から読取った。HIV-I DNA 及び β -グロブリン DNA標的についての色素濃度はそれぞれ3.8及び4.2であり、一方バックグラウンドの読取りは0.5であった。

プライマー(1 μ モル濃度)、
ゼラチン(0.01%)及び

サーマス・アクアティクス(*Thermus aquaticus*)から単離したDNAポリメラーゼ(7.5単位)から構成された。

HIV-I DNA 標的核酸は、M13/HIV(M13 DNA フェージ中にクローニングにされたHIV-Iの180塩基対セグメント)又はHUT細胞系DNA(HIV-Iゲノムの単一にまとまったコピーを含む細胞系)であった。 β -グロブリン標的核酸は、1細胞当たり β -グロブリン遺伝子の2コピーを含むと推定されるヒト胎盤DNAであった。

アッセイ:

HIV-I 及び β -グロブリン標的の両者の溶液(10 μ l、各々約 10^{-10} モル濃度)及びポリメラーゼ連鎖反応混合物(100 μ l)をエッペンドルフ加熱ユニットのエッペンドルフ管に添加し、次いで次のプロトコルを用いて30~33サイクルの、ポリメラーゼ連鎖反応に付した: 95℃で30秒間のインキュベーション(変性)、55℃で30秒間のインキュベーション(ハイブリッド形成)及び70℃で1分間のインキュベーション(重合)。増幅された標的核酸を含む溶液の一部(10 μ l)を、次にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液(10ミリモル濃度、pH8.3)、塩化カリウム(50ミリモル濃度)、塩化マグネシウム(10ミリモル濃度)及びゼラチン(0.01%)を含んでなる緩衝溶液(130 μ l)で希釈した。得られた溶液を次にエッペンドルフ管中で95℃で5分間加熱して2本鎖標的核酸

本発明を、その好ましい実施態様を特に参考にして詳細に述べてきたが、変更及び修正を本発明の精神及び範囲の中で行うことができることが理解されるであろう。

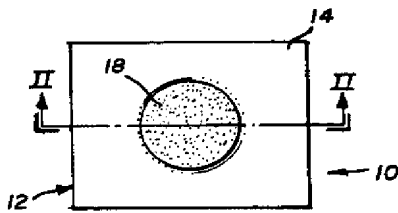


FIG. 1

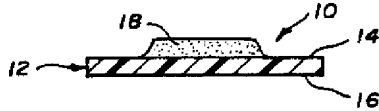


FIG. 2

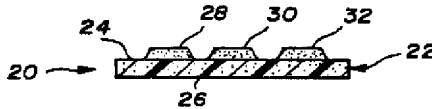


FIG. 3

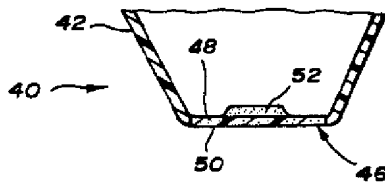


FIG. 4

國際調查報告

International Application No. PCT/US 90/00452

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If covers classification symbols apply, indicate only)
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC
IPC Class: C 12 Q 1/68, G 01 N 33/538

II. FIELD SEARCHED
Minimum Documentation Searched?
Classification System: Classification Symbols:
IPC Class: C 12 Q; G 01 N
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such documents are included in Fields Searched?

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category: Citation of Document(s) with indication, where appropriate, of the relevant paragraph(s)
Relevant to Claim No.?

A	EP, A2, 0265244 (AMOCO CORPORATION) 27 April 1988, see the whole document	1-27
A	WO, A1, 8810313 (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 25 October 1988, see the whole document	1-27
A	EP, A2, 0228075 (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 8 July 1987 see the whole document	1-27

IV. DEATIFICATION
Date of the Actual Completion of the International Search: 14th May 1990
Date of Mailing of this International Search Report: 30.05.90
International Searching Authority: EUROPEAN PATENT OFFICE
Signature of a Searcher: M. P. 3

Form PCT/ISA/819 (second sheet) (January 1985)

International Application No. PCT/US 90/00452

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)
Category: Citation of Document(s) with indication, where appropriate, of the relevant paragraph(s)
Relevant to Claim No.?

A	EP, A1, 0219842 (ALLIED CORPORATION) 29 April 1987, see the whole document	1-27
A	EP, A1, 0200381 (HYBRITECH INCORPORATED) 5 November 1986, see the whole document	1-27
A	EP, A1, 0063810 (CIBA-GEIGY AG) 3 November 1982, see the whole document	1-27
A	GB, A, 2156074 (ORION-YHTYMA OY) 2 October 1985, see the whole document	1-27

Form PCT/ISA/219 (second sheet) (January 1985)

國際調查報告

International Application No. PCT/US 90/00452

SA 34553

This sheet lists the patent family members relating to the present document cited in the above-mentioned international search report. The members are as appearing in the European Patent Office (EPO) file as of 07/05/88. The European Patent Office is in no way liable for inaccuracies which are merely given for the purpose of information.

Patent application cited in search report	Publication date	Patent family (members)	Publication date
EP-A2- 0265244	27/04/88	AU-D- 8809787 JP-A- 63188399 ZA-A- 8707772	28/04/88 03/08/88 26/04/88
WO-A1- 8810313	29/12/88	AU-D- 2084988 EP-A- 0296667	19/01/89 28/12/88
EP-A2- 0228075	08/07/87	JP-A- 62228360	07/10/87
EP-A1- 0219842	29/04/87	JP-A- 62143700	26/06/87
EP-A1- 0200381	05/11/86	JP-A- 61292059	22/12/86
EP-A1- 0063810	03/11/82	AU-B- 560790 AU-D- 8306982 CA-A- 1200761 GB-A-B- 2099678 JP-A- 58009070	16/04/87 04/11/82 18/02/86 06/12/82 19/01/83
GB-A- 2156074	02/10/85	AU-B- 577568 AU-D- 3842285 BE-A- 901671 CA-A- 1248695 CH-A-B- 671778 DE-A- 3305287 FR-A- 2559783 JP-A- 60188100 LU-A- 85768 NL-A- 8500424 SE-A- 8500733 SU-A- 1523053 US-A- 4731325	29/09/88 22/08/85 25/05/85 17/01/89 25/09/89 05/09/86 23/08/85 25/09/85 24/07/85 16/09/85 18/08/85 15/11/89 15/03/88

For more details about this patent family see Official Journal of the European Patent Office, No. 13/82

EPO FORM P447

第1頁の続き

⑫発明者	メイヤー, ジャニス マリー	アメリカ合衆国, ニューヨーク 14615, ロチエスター, パークウッド ロード 142
⑬発明者	キング, マーレン マリー	アメリカ合衆国, ニューヨーク 14526, ベンフィールド, ジェブハード ロード 28
⑭発明者	オークス, フレッド テリイ	アメリカ合衆国, ニューヨーク 14617, ロチエスター, スタントン レーン 216
⑮発明者	チャン, チューアン	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94530, エル セリット, リッチモンド ストリート 936
⑯発明者	レベンソン, コレイ ハワード	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94618, オークランド, マンダレイ ロード 311
⑰出願人	シタス コーポレイション	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94608, エミリービル, ファイフティ-サード ストリート 1400